

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5152862号  
(P5152862)

(45) 発行日 平成25年2月27日 (2013. 2. 27)

(24) 登録日 平成24年12月14日 (2012. 12. 14)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 27/447 (2006. 01)	GO 1 N 27/26	3 1 1 E
GO 1 N 33/561 (2006. 01)	GO 1 N 27/26	3 1 1 A
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 27/26	3 0 1 A
GO 1 N 21/78 (2006. 01)	GO 1 N 27/26	3 0 1 B
	GO 1 N 27/26	3 1 1 G
請求項の数 15 (全 17 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-283318 (P2008-283318)  
 (22) 出願日 平成20年11月4日 (2008. 11. 4)  
 (65) 公開番号 特開2009-265078 (P2009-265078A)  
 (43) 公開日 平成21年11月12日 (2009. 11. 12)  
 審査請求日 平成22年3月11日 (2010. 3. 11)  
 (31) 優先権主張番号 特願2008-97663 (P2008-97663)  
 (32) 優先日 平成20年4月4日 (2008. 4. 4)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

特許法第30条第1項適用 平成20年5月1日 日本  
 質量分析学会発行の「第56回質量分析総合討論会 (2  
 008) 講演要旨集」に発表

特許法第30条第1項適用 平成20年7月29日 日  
 本糖質学会発行の「第28回日本糖質学会年会要旨集」  
 に発表

(73) 特許権者 301021533  
 独立行政法人産業技術総合研究所  
 東京都千代田区霞が関1-3-1  
 (72) 発明者 亀山 昭彦  
 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法  
 人産業技術総合研究所つくばセンター内  
 (72) 発明者 松野 裕樹  
 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法  
 人産業技術総合研究所つくばセンター内  
 (72) 発明者 成松 久  
 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法  
 人産業技術総合研究所つくばセンター内

審査官 大竹 秀紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】疎水性ポリマー膜を有する電気泳動用媒体及びそれを用いた泳動分離方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

多孔質の疎水性ポリマー膜に親水性ポリマーを含浸付着させたことを特徴とする電気泳動用媒体。

【請求項2】

前記親水性ポリマーが、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリエチレンオキシド、ポリ2-ヒドロキシエチルメタクリレートから選ばれる少なくとも一種であることを特徴とする請求項1に記載の電気泳動用媒体。

【請求項3】

前記多孔質の疎水性ポリマー膜が、ポリビニリデンジフルオリド、ナイロン、ポリテトラフルオロエチレンから選ばれる少なくとも一種からなることを特徴とする請求項1又は2に記載の電気泳動用媒体。

【請求項4】

タンパク質またはムコ多糖の分離用であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の電気泳動用媒体。

【請求項5】

請求項1～4のいずれか1項に記載の電気泳動用媒体を用い、電気泳動によりタンパク質を分離することを特徴とするタンパク質の分離方法。

【請求項6】

前記タンパク質が、ムチン様糖タンパク質であることを特徴とする請求項5に記載のタ

ンパク質の分離方法。

【請求項 7】

前記タンパク質が、プロテオグリカン型糖タンパク質であることを特徴とする請求項 5 に記載のタンパク質の分離方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の電気泳動用媒体を用い、電気泳動によりムコ多糖を分離することを特徴とするムコ多糖の分離方法。

【請求項 9】

電気泳動によりタンパク質またはムコ多糖を分離するのに用いるキットであって、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の電気泳動用媒体を備えることを特徴とするタンパク質またはムコ多糖の分離用キット。

10

【請求項 10】

検体中に含まれるタンパク質を請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の分離方法により分離し、次いで分離された膜上のタンパク質に一次抗体として抗タンパク質抗体を反応させた後、酵素により標識した二次抗体を反応させ、発色試薬を用いて検出することを特徴とするタンパク質の分離検出方法。

【請求項 11】

検体中に含まれる糖タンパク質またはムコ多糖を請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の分離方法により分離し、次いで膜上の分離された糖タンパク質またはムコ多糖の糖鎖を過ヨウ素酸により酸化した後、色素を標識したアミン誘導体を反応させ検出することを特徴とする糖タンパク質またはムコ多糖の分離検出方法。

20

【請求項 12】

請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のタンパク質またはムコ多糖の分離方法により分離された糖タンパク質またはムコ多糖から糖鎖を遊離する方法であって、電気泳動に用いた媒体上で糖鎖遊離処理をおこなうことを特徴とする糖鎖の遊離方法。

【請求項 13】

電気泳動に用いた媒体上で糖鎖遊離処理をおこなうことによつて、電気泳動により分離された糖タンパク質またはムコ多糖から糖鎖を遊離するのに用いるキットであって、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の電気泳動用媒体を備えることを特徴とする糖鎖遊離用キット。

30

【請求項 14】

請求項 12 に記載の遊離方法で遊離された糖鎖を用いて、前記電気泳動により分離された糖タンパク質またはムコ多糖中の糖鎖構造を解析することを特徴とする糖鎖構造の解析方法。

【請求項 15】

電気泳動に用いた媒体上で糖鎖遊離処理をおこなうことによつて、電気泳動により分離された糖タンパク質またはムコ多糖から糖鎖を遊離し、該遊離された糖鎖を用いて、前記電気泳動により分離された糖タンパク質またはムコ多糖中の糖鎖構造を解析するのに用いるキットであって、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の電気泳動用媒体を備えることを特徴とする糖鎖構造の解析用キット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体由来試料のような複雑なタンパク質混合物中に存在するタンパク質、糖タンパク質或いはムコ多糖を泳動分離する方法、該方法に用いる電気泳動用媒体に関する。

【背景技術】

【0002】

生体内に存在するタンパク質は、癌などの疾患時にその発現量が変化することが知られており、疾患により変化した分子群を捕えることで、新規診断マーカーとしての応用が期

50

待できる。特に糖タンパク質は、疾患時の量的変化に加え、その糖鎖構造も変化することが知られており、疾患により変化した糖鎖構造やそれらを含む分子群を捕えることで、より優れた新規診断マーカーとして利用できる可能性がある。そのため、特定の性質によって分類される糖タンパク質群の選択的な分離分析法は、疾患の診断や治療にとって大切な臨床検査の1つとなる可能性が高い。例えば、セルロースアセテート膜電気泳動法は血清タンパク質の分離に使用され、分離パターンの変化や特定の分画の量的変化が臨床検査法として疾患の診断に利用されている。

#### 【0003】

ムチン様糖タンパク質は粘液中または粘膜上に存在し、セリン又はトレオニンのヒドロキシル基にO-グリコシド結合したN-アセチルガラクトサミンを介してムチン型糖鎖が結合していることを特徴とする糖タンパク質である。また、ムチン様糖タンパク質は糖含量が高い高分子量糖タンパク質として知られている。一方、ムコ多糖の代表であるグリコサミノグリカンは、動物の結合組織を中心にあらゆる組織に普遍的に存在し、多くの場合、プロテオグリカンとしてタンパク質に付加した形で存在している。プロテオグリカン型糖タンパク質は、セリンのヒドロキシル基にO-グリコシド結合したキシロースを介してグリコサミノグリカン鎖を持つことを特徴とする糖タンパク質である。また、タンパク質に結合していないグリコサミノグリカンとしてはヒアルロン酸が知られている。ヒアルロン酸は細胞外マトリクスに存在し、中皮腫のマーカー分子としても知られている。これらの糖タンパク質およびムコ多糖群はともに、疾患との関連が報告されており、新規診断マーカーのターゲット分子として重要である。また、肝癌マーカーや前立腺癌マーカーとして知られるフェトプロテインや前立腺特異抗原(PSA)などは、血清中に含まれる糖タンパク質である。このように、血清糖タンパク質もまた新規診断マーカーのターゲット分子として重要である。

従来、これらの糖タンパク質を分離する技術としては、分離状態を視覚的にとらえることができる電気泳動法が好ましく用いられており、具体的には、血清糖タンパク質を例にした場合、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、セルロースアセテート膜電気泳動、等電点ゲル電気泳動とSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を組み合わせた2次元電気泳動等がある。また、ムチン様糖タンパク質やプロテオグリカン型糖タンパク質を例にした場合、アガロースゲル或いはアガロース/ポリアクリルアミド混成ゲルを用いた電気泳動(非特許文献1, 2参照)、又はセルロースアセテート膜電気泳動(非特許文献3参照)等がある。

さらに、電気泳動法により分離した糖タンパク質の糖鎖を解析するためには、従来公知の転写法が適用できる。すなわち、電気泳動法により分離された糖タンパク質を、ゲルからポリビニリデンジフルオリド(PVDF, polyvinylidene difluoride)膜に転写した後、該膜上での酵素反応やアルカリ処理によるβ-エリミネーション(β-elimination)反応により糖鎖を切り出し、切り出された糖鎖を質量分析計で解析する方法が用いられる(非特許文献2)。

#### 【0004】

一方、電気泳動法による蛋白質の分離分析方法においては、特許文献1に、分子量4万~200万のデキストラン等の親水性高分子を含有させたセルロースアセテート膜を用いて電気泳動法により検体中のリポ蛋白質を分離する方法、及び分離したリポ蛋白質VLDL、LDL、HDLのサブクラスの存在形態を確認することにより、脂質代謝異常に起因する疾患を検出することが提案されている。

【特許文献1】特開2007-248131号公報

【非特許文献1】Spurr-Michaud S et al. Assay of mucins in human tear fluid. Exp. Eye Res. 2007, 84, 939-950

【非特許文献2】Thomsson KA, Schulz BL, Packer NH, Karlsson NG. MUC5B glycosylation in human saliva reflects blood group and secretor status. Glycobiology 2005, 15, 791-804.

【非特許文献3】Yasueda SI, Yamakawa K, Nakanishi Y, Kinoshita M, Kakehi K. Decr

10

20

30

40

50

eased mucin concentrations in tear fluids of contact lens wearers. J. Pharm. Bio med. Anal. 2005, 39, 187-195.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、従来公知のSDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点ゲル電気泳動とSDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動を組み合わせた2次元電気泳動、または非特許文献1, 2に記載されたアガロースゲル或いはアガロース/ポリアクリルアミド混成ゲルを用いた電気泳動法は、糖タンパク質を分離した後にPVD F膜に転写する工程を経るため、スループット性に欠け、臨床での診断法としての応用は困難である。また、転写効率に起因する定量性の低下などが問題となる。

10

また、特許文献1に記載の方法は、リポ蛋白質に関するものであって、糖タンパク質またはムコ多糖については何ら記載がないばかりでなく、この方法においても、電気泳動後のリポ蛋白質を、PVD F膜、ニトロセルロース膜等に転写した後、転写膜上のリポ蛋白質を確認しているため、非特許文献1、2に記載された方法の場合と同様の問題がある。

【0006】

一方、非特許文献3に記載されたセルロースアセテート膜電気泳動は、膜上でのムチン様糖タンパク質及びプロテオグリカン型糖タンパク質の分離が可能であり、転写工程の省略が期待できる。しかしながら、 $\beta$ -エリミネーション反応により生じる膜由来のセルロース誘導体が後の糖鎖分析の妨害となるため、この方法ではムチン様糖タンパク質及びプロテオグリカン型糖タンパク質の糖鎖構造情報を得ることができない。

20

【0007】

以上のとおり、糖タンパク質またはムコ多糖を電気泳動法によって分離した後、電気泳動に用いた膜のまま糖鎖遊離処理を行い、糖タンパク質またはムコ多糖の糖鎖分析を可能とする膜電気泳動法はこれまでなかった。また、電気泳動に用いた膜のまま抗体を利用する免疫染色によって検出することを可能とする膜電気泳動法はこれまでなかった。

本発明は、以上のような事情に鑑みてなされたものであって、マーカー探索や臨床現場での疾患診断に利用できる簡便なタンパク質またはムコ多糖の分離・分析法を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

30

【0008】

上述のように、PVD F膜を用いれば、膜上でのアルカリ処理による $\beta$ -エリミネーション反応により糖タンパク質の糖鎖を切り出すことができ、切り出された糖鎖を質量分析計で解析することが可能である。また、抗体を用いて特定のタンパク質を特異的に染色し、検出することも可能である。

そこで、本発明者らは、PVD F膜を、電気泳動の媒体として利用することができれば課題を解決できると考え、PVD F膜を電気泳動用媒体としてタンパク質またはムコ多糖を分離する方法について鋭意検討した結果、PVD F膜に親水性ポリマーの溶液を含浸させ、その膜を電気泳動の媒体として利用することにより、タンパク質またはムコ多糖を泳動・分離できることを見出した。

40

さらにPVD F膜の他、従来、電気泳動には使用されてこなかったタンパク質固定化用の疎水性ポリマー膜を用いたタンパク質、糖タンパク質或いはムコ多糖の分離について検討した結果、ポリテトラフルオロエチレン膜(PTFE)、ナイロン膜(Nylon)に親水性ポリマーの水溶液を含浸させた膜を用いた電気泳動によってもタンパク質、糖タンパク質或いはムコ多糖を泳動・分離できることを見出した。

【0009】

本発明は、これらの知見に基づいて完成に至ったものであり、以下のとおりのものである。

[1] 多孔質の疎水性ポリマー膜に親水性ポリマーを含浸附着させたことを特徴とする電気泳動用媒体。

50

[ 2 ] 前記親水性ポリマーが、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリエチレンオキシド、ポリ2-ヒドロキシエチルメタクリレートから選ばれる少なくとも一種であることを特徴とする[ 1 ]の電気泳動用媒体。

[ 3 ] 前記多孔質の疎水性ポリマー膜が、ポリビニリデンジフルオライド、ナイロン、ポリテトラフルオロエチレンから選ばれる少なくとも一種からなることを特徴とする[ 1 ]又は[ 2 ]の電気泳動用媒体。

[ 4 ] タンパク質またはムコ多糖の分離用であることを特徴とする[ 1 ] ~ [ 3 ]のいずれかの電気泳動用媒体。

[ 5 ] [ 1 ] ~ [ 4 ]のいずれかの電気泳動用媒体を用い、電気泳動によりタンパク質を分離することを特徴とするタンパク質の分離方法。

10

[ 6 ] 前記タンパク質が、ムチン様糖タンパク質であることを特徴とする[ 5 ]のタンパク質の分離方法。

[ 7 ] 前記タンパク質が、プロテオグリカン型糖タンパク質であることを特徴とする[ 5 ]のタンパク質の分離方法。

[ 8 ] [ 1 ] ~ [ 4 ]の電気泳動用媒体を用い、電気泳動によりムコ多糖を分離することを特徴とする多糖の分離方法。

[ 9 ] 電気泳動によりタンパク質またはムコ多糖を分離するのに用いるキットであって、[ 1 ] ~ [ 4 ]に記載の電気泳動用媒体を備えることを特徴とするタンパク質またはムコ多糖の分離用キット。

[ 10 ] 検体中に含まれるタンパク質を[ 5 ] ~ [ 8 ]の分離方法により分離し、次いで分離された膜上のタンパク質に一次抗体として抗タンパク質抗体を反応させた後、酵素により標識した二次抗体を反応させ、発色試薬を用いて検出することを特徴とするタンパク質の分離検出方法。

20

[ 11 ] 検体中に含まれる糖タンパク質またはムコ多糖を[ 5 ] ~ [ 8 ]の分離方法により分離し、次いで膜上の分離された糖タンパク質またはムコ多糖の糖鎖を過ヨウ素酸により酸化した後、色素を標識したアミン誘導体を反応させ検出することを特徴とする糖タンパク質またはムコ多糖の分離検出方法。

[ 12 ] [ 5 ] ~ [ 8 ]のタンパク質またはムコ多糖の分離方法により分離された糖タンパク質またはムコ多糖から糖鎖を遊離する方法であって、電気泳動に用いた媒体上で糖鎖遊離処理をおこなうことを特徴とする糖鎖の遊離方法。

30

[ 13 ] 電気泳動に用いた媒体上で糖鎖遊離処理をおこなうことによって、電気泳動により分離された糖タンパク質または多糖から糖鎖を遊離するのに用いるキットであって、[ 1 ] ~ [ 4 ]の電気泳動用媒体を備えることを特徴とする糖鎖遊離用キット。

[ 14 ] [ 12 ]の遊離方法で遊離された糖鎖を用いて、前記電気泳動により分離された糖タンパク質またはムコ多糖中の糖鎖構造を解析することを特徴とする糖鎖構造の解析方法。

[ 15 ] 電気泳動に用いた媒体上で糖鎖遊離処理をおこなうことによって、電気泳動により分離された糖タンパク質またはムコ多糖から糖鎖を遊離し、該遊離された糖鎖を用いて、前記電気泳動により分離された糖タンパク質またはムコ多糖中の糖鎖構造を解析するのに用いるキットであって、[ 1 ] ~ [ 4 ]のいずれか1項に記載の電気泳動用媒体を備えることを特徴とする糖鎖構造の解析用キット。

40

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、タンパク質固定化に用いられる疎水性の高いポリマー上でタンパク質、糖タンパク質或いはムコ多糖を泳動分離できることから、転写の工程を省略することができ、従来法に比べて分析のスループットが向上する。また、本発明は、迅速・簡便であり、抗体染色や糖鎖解析も可能であるため、タンパク質、糖タンパク質或いは多糖上の疾患関連糖鎖を指標とする診断キットへの応用が期待できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

50

本発明の、タンパク質、糖タンパク質或いはムコ多糖の分離分析法は、親水性ポリマー層を形成した疎水性のポリマー膜を用いた電気泳動法によるものである。

本発明に用いる疎水性のポリマー膜とは、タンパク質を疎水性相互作用によって強く結合保持する性質を有するポリマー膜であって、特にP V D F膜、ポリテトラフルオロエチレン膜(PTFE)、ナイロン膜(Nylon)を挙げることができるが、分解能の点からP V D F膜が最も好ましい。

これらの疎水性のポリマー膜とは、特許文献1、非特許文献2に記載されているように、本来、この膜に、精製したタンパク質溶液を添加するか、又はゲル電気泳動によって分離したタンパク質を転写し、膜上で糖タンパク質や抗原タンパク質などの同定をおこなうために、もっぱら、タンパク質固定化用に用いられているものである。

10

#### 【0012】

本発明においては、前記の多孔質の疎水性のポリマー膜に親水性ポリマーを含浸付着させた電気泳動用媒体を用いることにより、タンパク質、糖タンパク質或いはムコ多糖を、分離することが可能となるものである。

また、分離されたタンパク質、糖タンパク質或いはムコ多糖は、親水性ポリマーを有する疎水性のポリマー膜上にあるため、疎水性のポリマーに非セルロース系のものを用いれば、膜のまま - エリミネーション反応をおこなっても、従来のセルロース膜のように - エリミネーション反応による膜由来のセルロース誘導体が後の糖鎖分析の妨害となるようなことがない。すなわち、本発明のタンパク質、糖タンパク質或いはムコ多糖の分析方法によれば、転写工程を必要としない、簡便な方法でタンパク質、糖タンパク質或いはムコ多糖或いは糖タンパク質の分析が可能となるものである。

20

#### 【0013】

本発明に用いる多孔質の疎水性のポリマー膜には、従来、電気泳動法により分離されたタンパク質を転写する膜として用いられているものをそのまま使用できる。

該多孔質の疎水性のポリマー膜に、親水性のポリマーを含浸付着させる方法としては、具体的には、多孔質の疎水性のポリマー膜を親水性ポリマー溶液中に浸漬する方法、多孔質の疎水性のポリマー膜上に親水性ポリマーを塗布する方法、等の方法が挙げられる。

#### 【0014】

本発明において、親水性ポリマーとしては、ポリマーの構成ユニットに酸素や窒素のようなヘテロ原子を少なくとも一つ含むポリマーであって水接触角が60°以下の水との親和性を有するポリマーである。例としてポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、ポリエチレンオキシドなどが挙げられるが、特に、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールが、分離能の点から好ましく、最も好ましいのは、ポリビニルアルコールである。

30

なお、本発明の目的からみて、本発明に用いる親水性ポリマーには、デキストリン等の多糖系のポリマーが含まれないことは当然のことである。

また、本発明において用いられる親水性ポリマーの分子量としては、1,000~4,000,000が好ましい。

#### 【0015】

本発明に用いる装置としては、従来のセルロースアセテート膜電気泳動装置をそのまま用いることができ、具体的には、EPC105AA型セルロースアセテート膜電気泳動装置(アドバンテック)などが使用できる。

40

本発明の前記電気泳動用媒体を用いた電気泳動は、「蛋白質・酵素の基礎実験法」(南江堂)、「新生化学実験講座3・糖質II」(東京化学同人)等に記載された手法に従っておこなう。

すなわち、電気泳動用緩衝液としては、ペロナル緩衝液、トリス緩衝液、ピリジン-ギ酸緩衝液等を使用する。タンパク質および糖タンパク質の分離にはペロナル緩衝液やトリス緩衝液を中性付近のpHで使用するのが好ましい。ムチン様糖タンパク質およびプロテオグリカン型糖タンパク質に対してより明確な分離を行うにはピリジン-ギ酸緩衝液(pH3.0~pH5.0)が好ましい。また、検体の塗布量は、一般的には、1スポット

50

あたり、あるいは幅 1 cm あたり、0.8 ~ 2.4  $\mu$ L とされており、通電条件としては、幅 1 cm あたり 0.5 ~ 1.5 mA 程度の電流を流すことが好ましい。また、電気泳動中の媒体の温度は、一般的に 10 ~ 20 の範囲において、一定とする。

#### 【0016】

前述のとおり、本発明の前記電気泳動用媒体は、さらに別の膜に転写することなく、そのまま、糖鎖遊離処理をおこなうことができるものであるが、本発明における糖鎖遊離処理として、酵素を用いる遊離反応や、前記非特許文献 2 に記載された - エリミネーション反応が用いられる。

具体的には、酵素による遊離反応の場合、糖タンパク質を含むスポットあるいはバンドを切り取った膜片に、N - グリカナーゼなどの糖鎖切断酵素を含む溶液を加え、37 で一晩反応させる。反応後、塩類を除去することで遊離した糖鎖を得る。 - エリミネーション反応の場合、糖タンパク質を含むスポットあるいはバンドを切り取った膜片に、水酸化ナトリウムなどのアルカリと水素化ホウ素ナトリウムなどの還元剤を含む水溶液を加え 45 で 16 時間反応させる。反応後、酸で中和し、塩類を除去することで遊離した糖鎖を得る。

#### 【0017】

さらに、遊離された糖鎖の糖鎖構造を分析する方法としては、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、核磁気共鳴分析法 (NMR)、質量分析などがあるが、特に、質量分析法によるのが、感度、精度、そして簡便性の観点から好ましい。

また、前述のとおり、本発明の前記電気泳動用媒体は、さらに別の膜に転写することなく、そのまま、抗体染色により特定のタンパク質を検出することができるものである。

#### 【実施例】

#### 【0018】

以下、本発明を実施例によってさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

#### 実施例 1

本実施例では、ウシ顎下線ムチン (BSM)、ブタ胃ムチン (PSM)、及び血漿由来タンパク質を用いて電気泳動をおこなった。

#### 【0019】

(親水性ポリマーでコーティングした PVD F 膜の作成)

市販の PVD F 膜 (Immobilon-P, ミリポア社製) を適した大きさに切り取り、メタノールに数分間浸した。ついで、該 PVD F 膜をメタノールから取りだし、0.25% ポリビニルアルコール (PVA) を含む泳動用緩衝液 (0.1 M ピリジン - ギ酸緩衝液、pH 4.0) に 30 分間浸した。

試料をスポットする直前に、前記泳動用緩衝液から膜を取りだし、膜に付着した過剰の溶液をろ紙でかるく拭き取った後、使用した。

#### 【0020】

(分析試料の前処理)

BSM (50  $\mu$ g)、PSM (100  $\mu$ g)、血漿由来タンパク質 (血漿を脱塩して凍結乾燥したもの、約 50  $\mu$ g) を 20 mM ジチオトレイトールおよび 8 M 尿素を含む 0.1 M トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.6、10  $\mu$ l) に溶解し、100 で 20 分間反応させた。これを室温にて放冷後、250 mM ヨードアセタミド水溶液 (1  $\mu$ l、最終濃度 25 mM) を加え、室温で 1 時間、暗所にて反応させた。

反応後、試料溶液の一部 (1  $\mu$ l) を、前記の PVA でコーティングした PVD F 膜上にスポットし、電気泳動に供した。

#### 【0021】

(電気泳動)

泳動槽には、セルロースアセテート膜電気泳動装置 (EPC105AA 型、アドバンテック社製) を使用した。通電条件は、膜の幅 1 cm あたり 1.0 mA とし、泳動時間は 30 分間とした。

10

20

30

40

50

## 【0022】

(染色方法)

B S M及びP S Mの染色には、0.1%酢酸に溶解した0.1%アルシアンブルー-8 G X溶液を使用した。また、血漿由来タンパク質の染色には、40%エタノール/10%酢酸水溶液に溶解した0.008%のダイレクトブルー71溶液を使用した。

## 【0023】

(泳動結果)

泳動結果を図1に示す。左から順に、B S M、P S M、及び血漿由来タンパク質の結果であり、それぞれ、左側が、P V Aコーティングなしの媒体を用いた結果(比較例)、右側が、本発明の媒体を用いた結果を示している。

図1から、明らかのように、P V AコーティングしていないP V D F膜を用いて泳動した場合(比較例)、B S M、血漿由来タンパク質は原点からほとんど泳動されなかった。また、P S Mは僅かに泳動されたが、スポットのテーリングが観察され完全な分離には至らなかった。

一方、P V AコーティングしたP V D F膜を用いた場合(本発明)、B S Mは単一の成分として泳動され、P S Mでは4種類の成分として泳動分離された。しかし、血漿由来タンパク質はP V Aコーティングした場合においても原点から泳動されなかった。

このことから、本発明のP V AコーティングしたP V D F膜を電気泳動用媒体として用いることで、ムチン様糖タンパク質が選択的に泳動分離されることが分かった。

## 【0024】

(糖鎖の遊離)

次に、前記の本発明の方法により泳動分離されたB S M及びP S Mの各スポットを切り取り、膜ごとアルカリによる-エリミネーション反応を行い、ムチンのコアタンパク質から糖鎖を遊離させた。得られた糖鎖の完全メチル化誘導体を質量分析計で測定した結果を図2及び3に示す。

図2に示すとおり、B S Mでは主要な成分として4種類の糖鎖ピークが検出され、これらの質量数は報告されているB S M中の主要な糖鎖構造の質量数と一致した。

従って、本発明はムチン様糖タンパク質を分離した後の糖鎖解析にも使用できることが分かった。

さらに、図3に示すとおり、4種類の成分として分離されたP S Mでは、3と4の成分から糖鎖ピークが検出された。これらの2種類の成分のうち、早く泳動された成分3は硫酸化糖鎖の割合が多く、遅く泳動された成分4は中性糖の割合が多いことが分かった。このように本発明により分離されたP S M中の各成分は異なる糖鎖構造パターンを示したことから、本発明はムチン様糖タンパク質の中に複数存在している、糖鎖構造が異なる分子群を分離できることが分かった。

## 【0025】

(分解酵素で処理した試料の泳動)

図4に、コンドロイチナーゼA B C及びヒアルロニダーゼで処理した後のP S MをP V AコーティングしたP V D F膜で電気泳動した結果を示す。なお、参考として、処理しないP S Mの結果を図4aに示す。

図4bに示すように、コンドロイチン硫酸類の分解酵素であるコンドロイチナーゼA B Cで予め処理した試料を泳動した場合、P S M中の各成分のうち、より早く泳動された成分である1はスポットがほぼ消失した。従って、これらの成分はP S M中に混在しているコンドロイチン硫酸型プロテオグリカンであることが示唆された。

また、図4cに示すように、ヒアルロン酸の分解酵素であるヒアルロニダーゼで予め処理した試料を泳動した場合、P S M中の各成分のうち、より早く泳動された成分である2のスポットが消失した。従って、これらの成分はP S M中に混在しているヒアルロン酸であることが示唆された。

このことから、本発明はムチン様糖タンパク質のみならず、グリコサミノグリカン等のムコ多糖およびプロテオグリカン型糖タンパク質の解析にも応用できることが分かった。

10

20

30

40

50

## 【0026】

## 実施例 2

本実施例では、ヒト唾液中ムチンの本発明による分離、および糖鎖の過ヨウ素酸酸化を利用する糖タンパク質の染色と抗体による免疫染色を行った。

## 【0027】

(PVAでコーティングしたPVDF膜の作成)

実施例 1 と同様の手順により作成した。

## 【0028】

(分析試料の前処理)

ヒト唾液約 500  $\mu$ l を 10000 g で 5 分間遠心分離し、上清を限外ろ過膜 (100 kDa カット) により脱塩・濃縮した後、凍結乾燥したものを粗ムチン分画とした。凍結乾燥標品を 20 mM ジチオトレイトールおよび 8 M 尿素を含む 0.1 M トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.6、20  $\mu$ l) に溶解し、100 で 20 分間反応させた。これを室温にて放冷後、250 mM ヨードアセタミド水溶液 (2  $\mu$ l、最終濃度 25 mM) を加え、室温で 1 時間、暗所にて反応させた。

反応後、試料溶液を、8 M 尿素を含む 0.1 M トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.6) で 2 倍希釈し、その一部 (1  $\mu$ l) を、前記の PVA でコーティングした PVDF 膜上にスポットし、電気泳動に供した。

## 【0029】

(電気泳動)

実施例 1 と同様の手順により行った。

## 【0030】

(染色方法)

アルシアンブルーによる染色は実施例 1 と同様に行った。糖鎖の過ヨウ素酸酸化を利用する糖タンパク質の染色には Pro-Q Emerald (Molecular Probes 社) を使用した。抗体による免疫染色は、泳動後の膜を 5% 酢酸 / メタノール中で 30 分間振とうし、糖タンパク質を膜へ固定化した後、従来公知の方法に従い実施した。すなわち、固定化後の膜を PBS - T で振とう洗浄し、1% BSA を含む PBS - T 中で 1 時間振とうしてブロッキングした。膜を PBS - T で振とう洗浄後、抗 MUC7 ヤギ IgG を PBS - T で 200 倍希釈した溶液に浸し、3 時間振とうした。膜を PBS - T で振とう洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヤギ IgG を PBS - T で 1000 倍希釈した溶液に浸し、1 時間振とうした。PBS - T で振とう洗浄後、ECL 法により検出した。

## 【0031】

(泳動・染色結果)

ヒト唾液中ムチンの泳動結果ならびに各染色法により染色した結果を図 5 に示す。

ヒト唾液中のムチンを本発明により泳動した後、アルシアンブルーで染色した結果、図のようにブロードなバンドとして観察された (左の図)。一方、Pro-Q Emerald で染色した場合、アルシアンブルーで染色した場合と同様の染色パターンが得られた (中央の図)。抗 MUC7 抗体による免疫染色では、原点のタンパク質に対する顕著な抗体の非特異吸着が見られたものの、アルシアンブルーと Pro-Q Emerald により染色された部位が主に染色された (右の図)。また、免疫染色した時にのみ、速く泳動される成分がわずかに検出された。

以上の結果から、本発明による親水性ポリマーでコーティングされた PVDF 膜を用いる電気泳動によって分離された糖タンパク質は、糖鎖の過ヨウ素酸酸化を利用する糖タンパク質の染色や抗体による免疫染色によっても検出することが可能であることが分かった。

## 【0032】

## 実施例 3

(他の親水性ポリマーによる検討)

PVA以外の親水性ポリマーを用いて、実施例1と同様の手順によりPVDF膜をコーティングし、BSM、PSM、及び血漿由来タンパク質を泳動した結果を図6に示す。左から順に、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ポリ2-ヒドロキシエチルメタクリレートによりコーティングしたPVDF膜を用いた結果を示している。

図6から明らかのように、PVA以外の親水性ポリマーによってコーティングを行ってもPVAの場合と同等の効果が得られ、グリコサミノグリカンおよびムチン様糖タンパク質が選択的に泳動分離されることが分かった。

#### 【0033】

##### 実施例4

##### (血漿タンパク質の分離)

本発明は電気泳動に用いる緩衝液の種類を変えることによって、血漿タンパク質のような複雑なタンパク質混合物の分離にも使用することができる。泳動用緩衝液に0.06Mバルビタールナトリウム緩衝液(pH8.6)を用いて、本発明により血漿タンパク質を泳動した。また、比較としてセルロースアセテート膜電気泳動を行った。図7には、セルロースアセテート膜で電気泳動した結果と、本発明により泳動した結果を示して比較している。図7に示すようにセルロースアセテート膜電気泳動では血漿たんぱく質が6個の分画に分離されたのに対して、本発明では9個の分画に分離された。従って本発明は従来法に比べて分解能が高いことが分かった。

#### 【0034】

##### 実施例5

##### (他の疎水性高分子膜による検討)

PVDF膜以外の疎水性ポリマー膜についても実施例1と同様の手順によって、PVAによりコーティングし、これらの膜を用いて血漿タンパク質を分離した例を図8に示す。左からPVDF膜、ポリテトラフルオロエチレン膜(PTFE)、ナイロン膜(Nylon)を用いた結果を示している。使用する疎水性高分子膜によって泳動パターンは異なったが、電気泳動による分離が認められた。したがって、図8は本発明で使用する疎水性ポリマー膜がPVDF膜に限定されるものではないことを示している。

#### 【0035】

##### 実施例6

##### (血漿中のハプトグロビンの抗体染色)

実施例4と同様の手順により、本発明により血漿タンパク質を泳動した。ハプトグロビン抗体による免疫染色は、泳動後の膜をアセトン中で15分間振とうし、血漿タンパク質を膜へ固定化した後、従来公知の方法に従い実施した。すなわち、固定化後の膜を1%BSAを含むPBS中で1時間振とうしてブロッキングした。膜をPBS-T(0.05% tween)で5分間洗浄し、この洗浄操作を合計3回繰り返した。振とう洗浄後、ウサギ抗ヒトハプトグロビン抗体(IgG、1mg/mL)をPBS-Tで2000倍希釈した溶液に浸し、1時間振とうした。その後、膜をPBS-T(0.05% tween)で5分間洗浄し、この洗浄操作を合計3回繰り返した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識されたヤギ抗ウサギIgG抗体をPBS-Tで2000倍希釈した溶液に浸し、1時間振とうした。その後、膜をPBS-T(0.05% tween)で5分間洗浄し、この洗浄操作を合計3回繰り返した後、コニカイム

#### 【0036】

##### (染色結果)

ヒト血漿タンパク質の泳動結果ならびに抗ヒトハプトグロビンにより染色した結果を図9に示す。

ヒト血漿タンパク質を本発明により泳動した後、DB-71で染色した結果、図9のように9本のバンドとして観察された(図9-左)。一方、抗ハプトグロビン抗体で染色した場合、1本のバンドの染色パターンが得られた(図9-右)。ハプトグロビンは、従来用いられてきたセルロースアセテート膜電気泳動による血漿タンパク質のデータ(標準臨床検査医学 第2版 医学書院)との類似性から、バンド4に存在すると推定される。抗

10

20

30

40

50

ハプトグロビン抗体にて染色されたバンドは、バンド4に一致することから、本手法により血漿中のハプトグロビンを特異的に染色できたと考えられる。

【0037】

以上の結果から、本発明による親水性ポリマーでコーティングされたPVD F膜を用いる電気泳動によって分離されたタンパク質は、タンパク質固定化用の疎水性膜に転写することなく、抗体による免疫染色によって特異的に検出することが可能であることが分かった。

【産業上の利用可能性】

【0038】

本発明の多孔質の疎水性ポリマー膜に親水性ポリマーを含浸付着した電気泳動用媒体を用いると、タンパク質、糖タンパク質或いはムコ多糖を選択的に、明確に分離することができ、また、該媒体上で分離された糖タンパク質またはムコ多糖に、そのまま、糖鎖の遊離反応をさせて、糖タンパク質またはムコ多糖の中に存在する糖鎖構造の解析が可能となる。また、該媒体上で分離されたタンパク質、糖タンパク質或いはムコ多糖は、特異的抗体を用いた免疫染色法や、糖鎖の過ヨウ素酸酸化を利用する糖タンパク質の染色法による検出も可能である。これらのことから、本発明は疾患の検知に用いる検査キットとしての利用が期待される。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】BSM、PSM及び血漿由来タンパク質を、それぞれ、PVAコーティングしていないPVD F膜、及びPVAコーティングしたPVD F膜で電気泳動した結果を示す図

【図2】PVAコーティングしたPVD F膜で分離したBSMから糖鎖を遊離し、質量分析により解析した結果を示す図。

【図3】PVAコーティングしたPVD F膜で分離したPSMから糖鎖を遊離し、質量分析により解析した結果を示す図。

【図4】コンドロイチナーゼABCで処理する前のPSMと処理した後のPSMをPVAコーティングしたPVD F膜で電気泳動した結果を示す図。

【図5】ヒト唾液中のムチンをPVAコーティングしたPVD F膜により電気泳動した後、アルシアンブルー、Pro-Q Emerald、免疫染色により染色した結果を示す図。

【図6】BSM、PSM及び血漿由来タンパク質を、それぞれ、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ポリ2-ヒドロキシエチルメタクリレートによりコーティングしたPVD F膜で電気泳動した結果を示す図。

【図7】血漿由来タンパク質をセルロースアセテート膜とPVAコーティングしたPVD F膜で電気泳動した結果を示す図。

【図8】PVAコーティングしたPVD F膜、ポリテトラフルオロエチレン膜(PTFE)、ナイロン膜(Nylon)を用いて血漿由来タンパク質を電気泳動した結果を示す図。

【図9】ヒト血漿タンパク質の泳動結果ならびに抗ヒトハプトグロビンにより染色した結果を示す図。

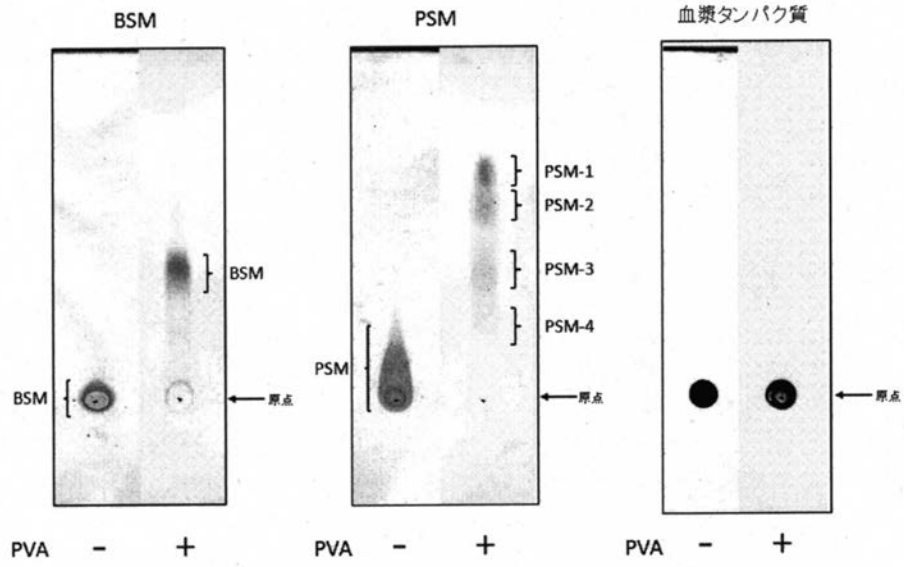
10

20

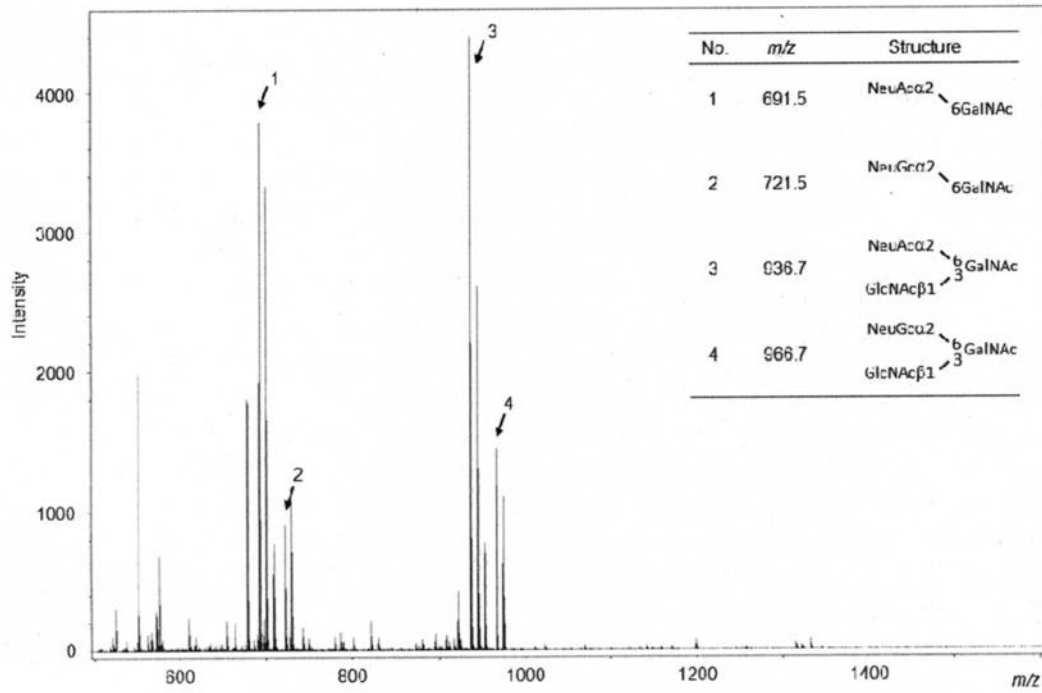
30

40

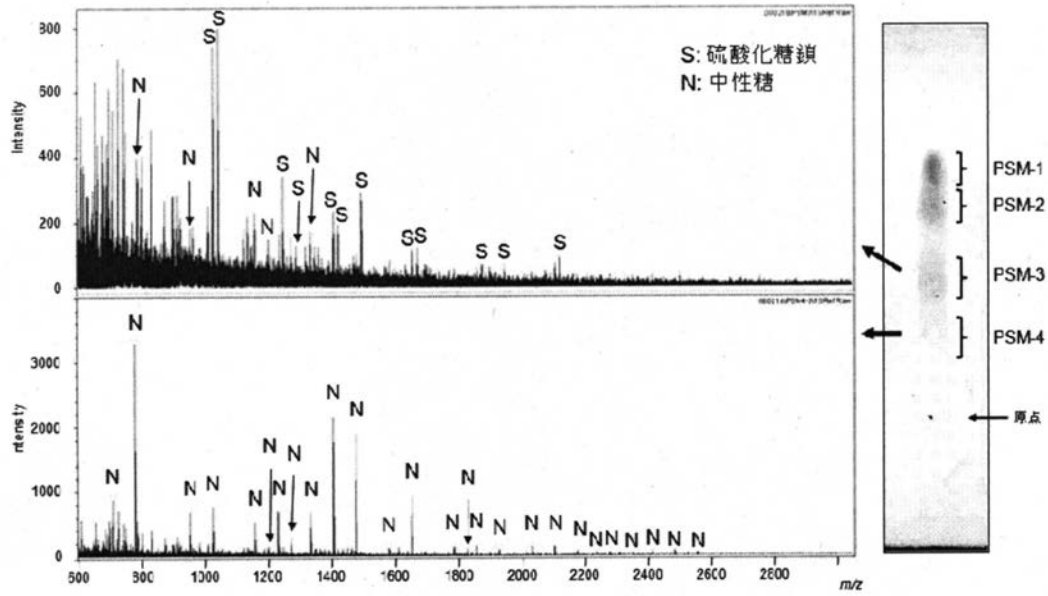
【 図 1 】



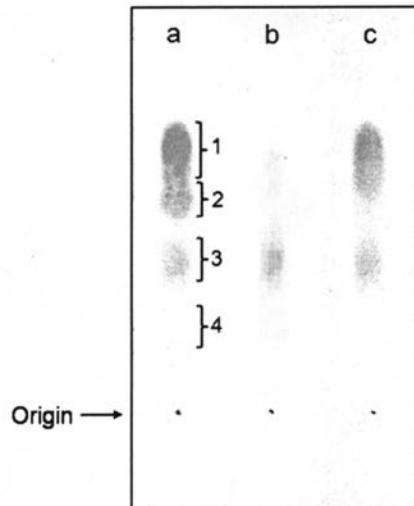
【 図 2 】



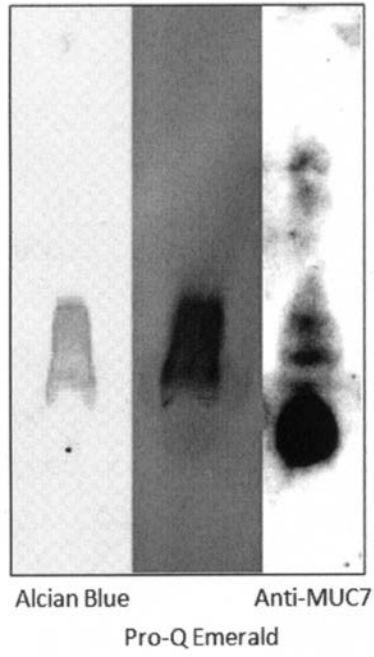
【 図 3 】



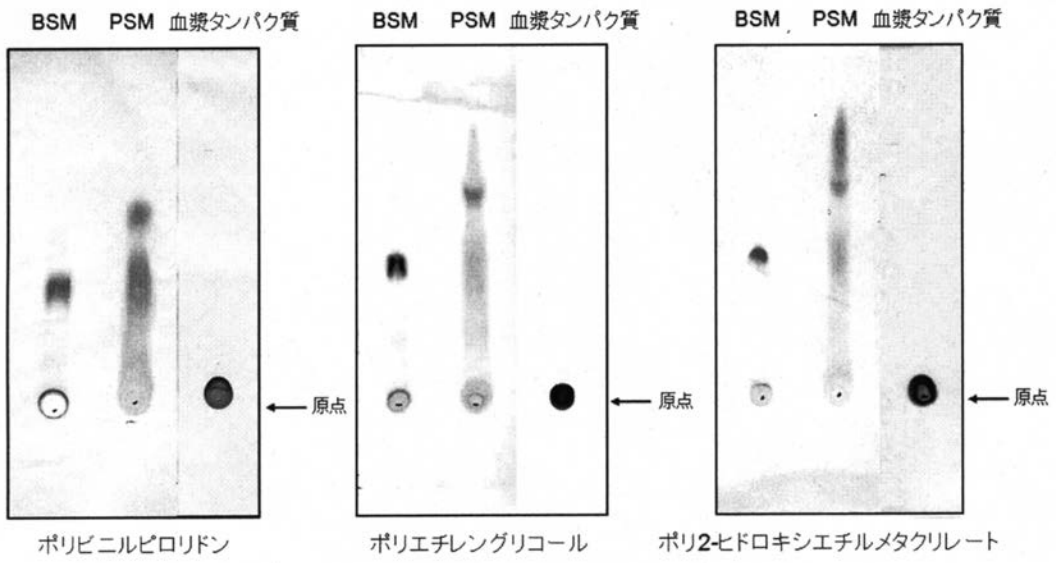
【 図 4 】



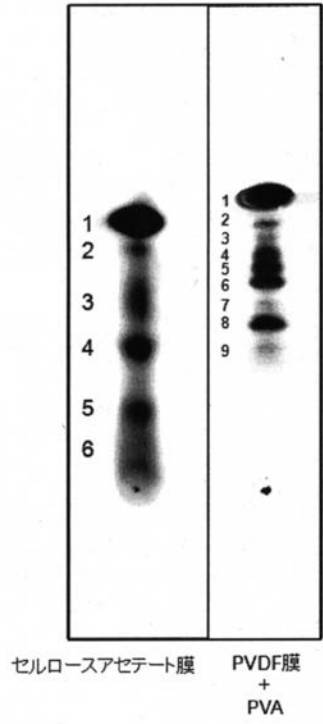
【 図 5 】



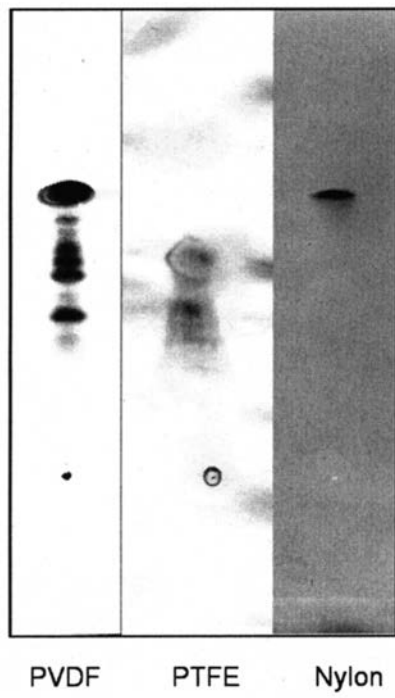
【 図 6 】



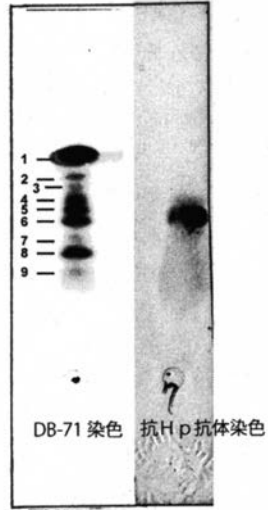
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



---

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
G 0 1 N 33/561  
G 0 1 N 33/53 D  
G 0 1 N 33/53 S  
G 0 1 N 21/78 Z

特許法第30条第1項適用 平成20年10月15日 第28回日本分子腫瘍マーカー研究会事務局発行の「第28回日本分子腫瘍マーカー研究会プログラム・講演抄録」に発表

(出願人による申告)平成19年度独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構委託研究「健康安心プログラム/糖鎖機能活用技術開発」産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(56)参考文献 特開2007-248131(JP,A)  
特開2007-529755(JP,A)  
特開2005-538379(JP,A)  
特開平04-043954(JP,A)  
特開平03-296657(JP,A)  
特開昭61-020849(JP,A)  
特開2000-046797(JP,A)  
特開昭61-280569(JP,A)  
特開平02-163650(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G 0 1 N 2 7 / 4 4 7  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I )

专利名称(译)	具有疏水性聚合物膜的电泳介质和使用其的电泳分离方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5152862B2</a>	公开(公告)日	2013-02-27
申请号	JP2008283318	申请日	2008-11-04
申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
[标]发明人	龜山昭彦 松野裕樹 成松久		
发明人	龜山 昭彦 松野 裕樹 成松 久		
IPC分类号	G01N27/447 G01N33/561 G01N33/53 G01N21/78		
CPC分类号	G01N27/44704 C07K1/26 C07K9/00 C07K17/08 Y10T436/143333		
FI分类号	G01N27/26.311.E G01N27/26.311.A G01N27/26.301.A G01N27/26.301.B G01N27/26.311.G G01N33/561 G01N33/53.D G01N33/53.S G01N21/78.Z G01N27/447.301.A G01N27/447.301.B G01N27/447.311.A G01N27/447.311.E G01N27/447.311.G		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AB07 2G054/BB03 2G054/CA23 2G054/CA25 2G054/CE02 2G054/EA06		
优先权	2008097663 2008-04-04 JP		
其他公开文献	JP2009265078A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种膜电泳方法，用于通过电泳法分离蛋白质，糖蛋白或多糖后使用用于电泳的膜实现糖链脱离，并实施多糖的糖链分析和糖蛋白，或提供能够通过使用抗体进行免疫染色检测的膜电泳方法。  
 解决方案：通过在疏水性聚合物膜的整个表面上施加亲水性聚合物或将疏水性聚合物膜浸入亲水性聚合物溶液中，形成在疏水性聚合物膜上包含亲水性聚合物的层作为电泳载体。之

图 2 ]

